

Margarin





© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	1
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan	3
Lampiran A Cara uji margarin.....	4
Bibliografi	38
Tabel 1 - Syarat mutu margarin	1

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Margarin* ini merupakan revisi SNI 01-3541-2002 *Margarin*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri margarin.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No.5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No.36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 722/MENKES/PER/IX/1988, tentang Bahan Tambahan Makanan atau revisinya.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan Yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
10. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04 *Makanan dan Minuman* Kementerian Perindustrian, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 12 Oktober 2010 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jejak pendapat pada tanggal 22 Maret 2011 sampai dengan tanggal 21 Mei 2011 dan 27 Februari 2012 sampai dengan tanggal 26 April 2012 serta pemungutan suara pada tanggal 24 Mei 2013 sampai dengan tanggal 23 Agustus 2013 dengan hasil akhir RASNI.

Margarin

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu dan cara uji margarin.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

margarin

produk pangan berbentuk emulsi (w/o) padat, semipadat atau cair, yang dibuat dari lemak makan dan atau minyak makan nabati dan air dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

3.2

margarin meja

margarin yang ditujukan untuk langsung dimakan, tanpa diolah lebih lanjut dengan penambahan vitamin A dan D

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Minyak dan atau lemak nabati, dan air

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk margarin sesuai dengan ketentuan yang berlaku bila diperlukan, margarin dapat pula mengandung lemak susu yang kandungannya maksimum 3% dari total lemak

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk margarin sesuai dengan ketentuan yang berlaku

5 Syarat mutu

Syarat mutu margarin sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu margarin

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal

Tabel 1 - Syarat mutu margarine (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1.2	Warna	-	normal
1.3	Rasa	-	normal
2	Kadar air (b/b)	%	maks. 18
3	Kadar lemak (b/b)	%	min. 80
4	Vitamin A	IU/100 g	2500-3500*
5	Vitamin D	IU/100 g	250-350*
6	Cemaran logam		
6.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks.0,2
6.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,1
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks 40/250**
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
6.5	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	maks.0,1
7	Cemaran mikroba		
7.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 1×10^5
7.2	<i>Coliform</i>	APM/g	maks.10
7.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
7.4	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif/25 g
7.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. 1×10^2
Keterangan: * dipersyaratkan untuk produk margarin meja ** untuk produk yang dikemas dalam kaleng			

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk margarin seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.3

- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji vitamin A sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji vitamin D sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.7.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.7.3
- h) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.8
- i) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.9.1
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.9.2
 - Cara uji *Coliform* dan *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.9.3
 - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.9.4
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.9.5

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 5.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A
(normatif)

Cara uji margarin

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh margarin dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh margarin dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh margarin dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal" ; dan
- jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Warna

A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- c) Jika terlihat warna kuning hingga kuning pucat atau warna lain sesuai dengan yang tercantum dalam label maka hasil dinyatakan "normal";
- d) jika terlihat warna lain selain warna yang tercantum dalam label maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Rasa**A.2.3.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis terlatih.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.3 Kadar air**A.3.1 Prinsip**

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

A.3.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi pasir laut; dan
- d) Pinggan aluminium tertutup dengan diameter minimal 50 mm dan tinggi atau kedalaman kurang atau sama dengan 20 mm.

A.3.3 Cara kerja

- a) Panaskan pinggan aluminium beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama 1 jam, kemudian dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- b) masukkan 1,5 sampai dengan 2,5 g contoh ke dalam pinggan, tutup, dan timbang (W_1);
- c) panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan disamping pinggan di dalam oven pada suhu $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama 30 menit setelah suhu oven $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$;

- d) tutup pinggan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang (W_2);
- e) ulangi lagi pemanasan dengan oven selama 1 jam, dinginkan dan timbang lagi;
- f) ulangi proses ini sehingga perbedaan antara dua penimbangan kurang 1 mg;
- g) catat hasil penimbangan yang terendah;
- h) lakukan pekerjaan duplo; dan
- i) hitung kadar air dalam contoh.

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 10%, maka uji harus diulang kembali.

A.4 Kadar lemak

A.4.1 Prinsip

Pengurangan contoh dengan kadar air dan residu untuk *unsalted margarine* dan pengurangan contoh dengan kadar air, residu dan garam untuk *salted margarine*.

A.4.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Erlenmeyer 250 mL; dan
- d) Cawan *Gooch* atau cawan kaca masir.

A.4.3 Perekasi

- a) Eter absolut atau petroleum eter;
- b) Indikator K_2CrO_4 ; dan
- c) $AgNO_3$ 0,1 M

A.4.4 Cara kerja residu

- a) Timbang 1,5 sampai dengan 2,5 g contoh, keringkan dalam oven 100 °C (W_1);
- b) larutkan dengan 15 mL eter absolut atau petroleum eter;
- c) tuangkan ke dalam cawan *Gooch* atau cawan kaca masir yang sudah diketahui bobotnya;
- d) bilas lemak dari contoh dengan 100 mL pelarut di atas;
- e) tuangkan 25 mL pelarut ke dalam cawan tanpa disedot dengan vakum;
- f) keringkan cawan pada oven 100 °C dan timbang hingga bobot tetap; dan

- g) ulangi pencucian dengan 25 mL pelarut dan keringkan cawan pada oven hingga bobot tetap (W_2).

Tetapkan residu (r):

$$r (\%) = \frac{W_2}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W_1 adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot residu, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.5 Cara kerja garam

- Timbang 5 g contoh ke dalam Erlenmeyer 250 mL (W);
- tambah 100 mL air panas;
- kocok selama 5 sampai dengan 10 menit sampai suhu 50 sampai dengan 55 °C;
- tambah 2 mL indikator K_2CrO_4
- titar dengan $AgNO_3$ 0,1 M sampai berwarna oranye kecoklatan tidak berubah selama 30 detik (V);
- hitung kadar NaCl dengan menggunakan rumus:

$$NaCl (\%) = V \times 0,585/W$$

Keterangan :

V adalah volume titrasi $AgNO_3$ 0,1 M, dinyatakan dalam mililiter (mL);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.6 Perhitungan

Kadar lemak untuk *unsalted margarine* (%) = $100 - (a + r)$

Kadar lemak untuk *salted margarine* (%) = $100 - (a + r + NaCl)$

Keterangan :

a adalah kadar air, dinyatakan dalam persen (%);

r adalah residu, dinyatakan dalam persen (%).

NaCl adalah kadar garam, dinyatakan dalam (%)

A.4.7 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil lemak. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.5 Vitamin A

A.5.1 Prinsip

Standar dan contoh disabunkan dalam larutan basa etanol-air, dinetralkan, dan dilarutkan, sehingga mengubah lemak menjadi asam lemak dan ester retinol menjadi retinol. Retinol dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor ultraviolet (UV) pada panjang gelombang 328 nm.

A.5.2 Peralatan

- a) Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan pompa bertekanan tinggi dengan laju alir 1,0 mL / min sampai dengan 20 mL/min, injektor, kolom *reversed-phase* C18, 10 μ (4,6 x 250 mm) *Lichosperc* 100 RP-18, detektor ultraviolet (UV) dengan panjang gelombang 328 nm, *recorder*, *integrator*, siring berukuran 0 μ L sampai dengan 50 μ L atau *autosampler*,
- b) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) pemanas listrik;
- d) kondensor refluks;
- e) ultrasonik;
- f) Erlenmeyer berwarna gelap 125 mL;
- g) labu ukur 100 mL, 25 mL, dan 10 mL terkalibrasi;
- h) gelas ukur 50 mL terkalibrasi; dan
- i) pipet ukur 5 mL, 2 mL, dan 1 mL terkalibrasi.

A.5.3 Pereaksi

- a) Standar vitamin A asetat *Sigma* (ekivalen dengan 30 mg retinol/g minyak);
- b) asam asetat glasial;
- c) metanol *HPLC grade*;
- d) etanol 95 %;
- e) tetrahidrofur (THF);
- f) kristal asam pirogalat;
- g) fase gerak: campurkan 860 mL metanol dan 140 mL aquabides, kocok, (hilangkan gas menggunakan ultrasonik);
- h) larutan tetrahidrofur:etanol (50:50) sebanyak 1 L; campurkan 500 mL larutan tetrahidrofur (THF) dan 500 mL etanol 95%, kemudian kocok hingga homogen;
- i) larutan KOH 50%; larutkan 500 gram KOH dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda tera; dan
- j) heksana.

A.5.4 Cara kerja

A.5.4.1 Penyiapan larutan standar

A.5.4.1.1 Larutan baku standar vitamin A 15 μ g/mL (500 IU/mL) menggunakan vitamin A asetat

- a) Timbang 50 mg vitamin A asetat dengan teliti ke dalam labu ukur berwarna gelap 100 mL;
- b) tambahkan sedikit aseton (kurang dari 3 mL) aseton untuk membantu pelarutan;
- c) larutkan hingga tanda tera menggunakan etanol 95 %; dan
- d) simpan pada suhu 4 °C dalam ruang gelap (larutan ini stabil dalam 2 minggu).

A.5.4.1.2 Larutan deret standar vitamin A

- a) Pipet 5 mL larutan baku standar vitamin A 500 IU/mL ke dalam Erlenmeyer kemudian tambahkan 25 mL etanol 95% dan 40 mg asam pirogalat;
- b) pipet 2 mL larutan baku standar vitamin A 500 IU/mL ke dalam Erlenmeyer kemudian tambahkan 33 mL etanol 95% dan 40 mg asam pirogalat;
- c) pipet 0,5 mL larutan baku standar vitamin A 500 IU/mL ke dalam Erlenmeyer kemudian tambahkan 37,5 mL etanol 95% dan 40 mg asam pirogalat.

A.5.4.2 Penyiapan contoh

- Timbang bahan uji sebanyak 2 g (W) (mengandung $\pm 50 \mu\text{g}$ vitamin A) ke dalam Erlenmeyer dan panaskan sampai cair, kemudian tambahkan 40 mL etanol 95%;
- tambahkan asam pirogalat ($\pm 50 \text{ mg}$) sebagai antioksidan;
- goyang semua Erlenmeyer yang berisi larutan deret standar vitamin A dan contoh untuk memastikan semua bahan tercampur merata.

A.5.4.3 Ekstraksi dan penyabunan

- pipet 10 mL KOH 50% ke dalam setiap Erlenmeyer dan biarkan selama 30 menit sambil digoyang tiap 10 menit;
- pipet 10 mL asam asetat glasial masukkan ke dalam setiap Erlenmeyer untuk menetralkan KOH;
- aduk rata dan biarkan dingin sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan ini dengan teliti ke dalam labu volumetrik berwarna gelap 100 mL dan tambahkan THF-etanol 95% (50 : 50) sampai tanda tera;
- bolak-balikkan labu sebanyak 10 kali. Biarkan labu selama 1 jam atau 1 malam di dalam lemari es untuk mengendapkan asam lemak yang terbentuk selama proses penyabunan sehingga diperoleh hasil yang lebih baik. Dalam kasus tertentu, sentrifugasi dapat digunakan untuk mempercepat pengendapan;

A.5.4.4 Penetapan

- Nyalakan alat KCKT, biarkan stabil selama ± 30 menit, dengan fase gerak mengalir pada 1 mL/ menit;
- injeksikan larutan standar vitamin A yang telah melalui proses penyabunan;
- atur fase gerak untuk mendapatkan resolusi 1,5 atau lebih baik untuk bentuk cis dan trans. Semua trans retinol larut dalam waktu ± 9 menit. Cis retinol akan larut sebagai sebuah *peak* kecil sebelum terbentuk trans;
- injeksikan standar konsentrasi tinggi, sedang, dan rendah;
- atur sensitivitas detektor untuk memberikan *peak* 50% sampai dengan 90% dari skala penuh untuk standar konsentrasi tinggi;
- ulangi injeksi standar sampai diperoleh puncak tertinggi;
- injeksikan larutan contoh diselingi dengan injeksi standar tiap 9 kali pengujian; dan
- jika retinol di dalam contoh uji melebihi *peak* standar konsentrasi tinggi sebanyak $> 25\%$, larutkan contoh menggunakan larutan 10 mL KOH 50%, 40 mL etanol 96%, 10 mL asam asetat glasial, dan 40 mL THF- etanol 95% (50 : 50).

A.5.4.5 Perhitungan

Tentukan faktor kalibrasi dengan rumus:

$$\text{RFA} = \frac{\text{mg std} \times \text{mL std} \times \text{C std}}{\text{PkHt std} \times 10000}$$

Keterangan:

mg std adalah bobot standar, dinyatakan dalam miligram (mg);
 mL std adalah volume injek, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 C std adalah konsentrasi standar;
 PkHt std adalah *peak area* standar

$$\text{Vitamin A (IU/g)} = \frac{RF_A \times PkHT_{sp} \times fp}{w}$$

Keterangan:

- RF_A adalah faktor kalibrasi;
 $PkHT_{sp}$ adalah luas area contoh;
 Fp adalah faktor pengenceran
 w adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.5.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10% dari nilai rata-rata hasil kandungan vitamin A. Jika kisaran lebih besar dari 10%, maka analisis harus diulang kembali.

A.6 Vitamin D**A.6.1 Prinsip**

Setelah penambahan standar internal vitamin D₂ dan hidrolisis awal, vitamin D₃ diekstrak dengan n-heptana. Fraksi yang mengandung vitamin D₂/D₃ dipisahkan dengan kromatografi cair fase terbalik (*reversed phase*) dengan detektor UV pada panjang gelombang 265 nm.

A.6.2 Peralatan

- Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan detektor UV, integrator, Kolom *Lichosperc* 100 RP-18, kecepatan alir : 1,0 mL/min, siring 50 µ;
- Volume injek Vitamin D 20 µl (sesuai kebutuhan);
- Panjang gelombang-vitamin D : 265 nm;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Rotary evaporator*;
- Magnetik *stirrer*;
- Labu pemisah/labu kocok 500 mL;
- Labu didih berdasar bulat 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL terkalibrasi;
- Labu ukur 100 mL, 25 mL, dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Pipet ukur 5 mL, 2 mL, dan 1 mL terkalibrasi.

A.6.3 Perekasi dan bahan-bahan

- Pelarut : metanol, n-heptan, *methyl-tert-butyl ether* (MTBE), sikloheksan, isopropanol dan asetonitril;
- Etanol absolut;
- Asam askorbat p.a;
- Etanol 40%;
larutkan 400 mL etanol p.a dengan air suling hingga 1 liter;
- Aquabides;
- KOH 50% (b/b);
larutkan 500 g KOH padat dalam 500 mL air suling;
- Larutan KOH 1 M;
larutkan 56 g KOH padat dalam aquabides hingga 1 liter;
- Larutan indikator Phenolftalein (PP) 1% (b/v);
larutkan 1 gram Phenolftalein dalam etanol, encerkan hingga 100 mL;
- BHT-2,6-Di-tert-butyl-methylphenol;
- Larutan sikloheksan-n-heptan (1:1);

- larutkan 500 mL sikloheksana sampai dengan 1 liter menggunakan n-heptan; dan
- k) Larutan fase gerak: metanol-asetonitril (20:80);
larutkan 200 mL metanol sampai 1 liter menggunakan asetonitril.

A.6.4 Cara Kerja

A.6.4.1 Penyiapan Standar

A.6.4.1.1 Vitamin D₂ ergocalciferol

A.6.4.1.1.1 Larutan Stok Standar 1,0 mg/mL

- Timbang dengan teliti $\pm 0,1$ g vitamin D₂;
- larutkan dengan etanol;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.6.4.1.1.2 Larutan Standar Kerja 20 μ g/mL

- Pipet 2 mL larutan stok standar;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.6.4.1.1.3 Larutan Standar Internal 0,8 μ g/mL

- Pipet 4 mL larutan standar kerja;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.6.4.1.2 Vitamin D₃ cholecalciferol

A.6.4.1.2.1 Larutan Stok Standar 1,0 mg/mL

- Timbang dengan teliti $\pm 0,1$ g vitamin D₃;
- larutkan dengan etanol;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.6.4.1.2.2 Larutan Standar Kerja 20 μ g/mL

- Pipet 2 mL larutan stok standar;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.6.4.1.2.3 Larutan Standar Internal 0,6 μ g/mL

- Pipet 3 mL larutan standar kerja 20 μ g/mL;
- masukkan ke dalam labu ukur 100 mL; dan
- impitkan hingga tanda garis dengan etanol.

A.6.4.1.3 Larutan Deret Standar Vitamin D₂ dan D₃ 5 μ g/mL

- Pipet masing-masing 0,5 mL larutan stok standar Vitamin D₂ dan vitamin D₃ ke dalam labu alas bulat;

- b) uapkan sampai kering;
- c) larutkan residu di dalam sikloheksana-n-heptana (1+1) sampai 100 mL;
- d) pipet 0,8 mg/mL dari kedua vitamin tersebut lalu larutkan 2 mL dari masing-masing larutan standar kerja ke 50 mL dengan asetonitril; dan
- e) Larutan standar induk akan stabil dalam gelap pada suhu -18 °C. Buang jika telah lewat 12 bulan atau jika kemurnian berkurang hingga <90%. Larutan standar harus disesuaikan dengan suhu ruang sebelum digunakan. Stabilitasnya tidak terpengaruhi oleh pendinginan berulang-ulang (-18 °C) dan pemanasan (suhu ruang) standar kerja dan standar internal harus dibuat sebulan sekali dan disimpan pada suhu 4 sampai dengan 8 °C.

A.6.4.2 Penyiapan Contoh

A.6.4.2.1 Penyabunan

- a) Timbang dengan teliti 2 sampai dengan 8 g contoh;
- b) masukkan ke dalam Erlenmeyer 300 mL bertutup asah;
- c) tambahkan 0,5 gram askorbat dan 50 mL larutan etanol;
- d) kemudian tambahkan 2 mL larutan internal standar vitamin D₂ dan 20 mL KOH 50%;
- e) kocok sampai campur;
- f) tambahkan 10 mL larutan KOH 60%;
- g) kocok kembali dan bilas dinding Erlenmeyer dengan 10 mL etanol;
- h) biarkan larutan di tempat gelap selama 20 jam; dan
- i) kocok larutan dengan menggunakan magnetik stirrer selama 60 menit.

A.6.4.3 Ekstraksi

- a) Masukkan dengan teliti larutan hasil penyabunan ke dalam labu pemisah 500 mL;
- b) tambahkan 100 mL etanol 40%;
- c) tambah 75 mL n-heptana;
- d) kemudian kocok dengan cepat;
- e) biarkan larutan terpisah;
- f) pindahkan lapisan heptana ke dalam labu pemisah 250 mL;
- g) ulangi perlakuan ini sekali lagi dan gabungkan hasil ekstraknya;
- h) cuci larutan gabungan heptana hasil ekstrak dengan 50 mL KOH 1 M;
- i) kemudian cuci 2x dengan 50 mL etanol 40%;
- j) cuci dengan 50 mL akuades sampai larutan bebas basa (fase air harus tidak berwarna);
- k) pindahkan larutan ke dalam labu dasar bulat berleher asah;
- l) tambahkan beberapa butir BHT dan 15 mL etanol;
- m) uapkan dengan menggunakan *vakum evaporator* hingga kering;
- n) larutkan residu dengan larutan sikloheksan-n-heptan (1:1); dan
- o) larutan siap untuk diinjek (larutan tahan selama semalam pada suhu 4 sampai dengan 8 °C).

A.6.5 Perhitungan

Kandungan Vitamin D₃ (µg/g) dalam contoh dapat dihitung dengan rumus:

$$C_s = \frac{AD_3 \times WD_2 \times 100}{AD_2 \times W_s \times F}$$

Keterangan :

C_s adalah konsentrasi contoh, dinyatakan dalam persen (%);

AD₂ adalah area vitamin D₂;
 AD₃ adalah area vitamin D₃;
 WD₂ adalah bobot vitamin D₂, dinyatakan dalam mikrogram (µg);
 Ws adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 F adalah faktor respon (D₃/D₂).

Tetapkan faktor respon (f):

$$F = (\text{peak area } D_3 / \text{peak area } D_2) \times cD_2 / cD_3$$

Keterangan :

cD₂ adalah konsentrasi vitamin D₂ (internal standar), dinyatakan dalam persen (%);
 cD₃ adalah konsentrasi vitamin D₃ (internal standar), dinyatakan dalam persen (%);

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10% dari nilai rata-rata hasil kandungan Vitamin D. Jika kisaran lebih besar dari 10%, maka analisis harus diulang kembali.

A.7 Cemaran logam

A.7.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.7.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan *Flame* atau tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 10 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 sampai dengan 25 µm.

A.7.1.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
 encerkan 7 mL HNO₃ pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;

encerkan 500 mL HCl pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.

- e) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Cd 1000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb.
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.7.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa (W);
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5)^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5)^\circ\text{C}$ kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan aquabides, jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring ke dalam botol polipropilen;

- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam, (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.7.2 Timah (Sn)

A.7.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.7.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Labu ukur 1000 mL, 100 mL dan 50 mL, terkalibrasi;
- g) Pipet ukur berskala 0,1 mL terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur 50 mL terkalibrasi; dan
- j) Gelas piala 250 mL.

A.7.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air suling menjadi 100 mL.
- b) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- c) Asam klorida, HCl pekat;
- d) Larutan baku 1000 mg/mL Sn ; dan

larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

e) Larutan baku kerja Sn.

Pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1000 mg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.7.2.4 Cara Kerja

- Timbang contoh 10 g sampai dengan 20 g (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL aquabides (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.7.3 Merkuri (Hg)

A.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.7.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL.

A.7.3.3 Bahan dan Pereaksi

- Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%;
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 tambahkan mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
pipet 1 mL larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- Larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis.

Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 µg/mL; 0,005 µg/mL; 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL Hg; dan

l) Batu didih.

A.7.3.4 Cara kerja

A.7.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1) melalui pendingin,
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan

j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg), (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

fp adalah faktor pengenceran

A.7.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.8 Cemarkan arsen (As)

A.8.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.8.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Burner* atau *bunsen*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL.
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL terkalibrasi;
- Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen kapasitas 50 mL; dan
- Gelas piala 200 mL.

A.8.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis ke dalam labu ukur 500 mL.

- g) Larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10%;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida, KI 20%;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku As 1000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- m) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- n) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.8.4 Cara kerja

A.8.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) kedalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;

- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam microwave digester dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner atau bunsen serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As), (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.8.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.9 Cemarkan mikroba

A.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, bakteri *Coliform*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

A.9.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi

yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.9.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan putaran 10000 rpm sampai dengan 12000 rpm;
- Otoklaf terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Neraca kapasitas 2000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettors*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting dan spatula steril.

A.9.1.3 Larutan pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- air suling 500 mL

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer, 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 mL dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

A.9.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.9.2 Angka lempeng total

A.9.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$.

A.9.2.2 Peralatan

- Inkubator $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air bersirkulasi $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- Alat penghitung koloni terkalibrasi;
- Tally register*;
- Botol pengencer 160 mL, terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* atau *pipettor* terkalibrasi; dan

- i) Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.9.2.3 Pembenihan dan pengenceran

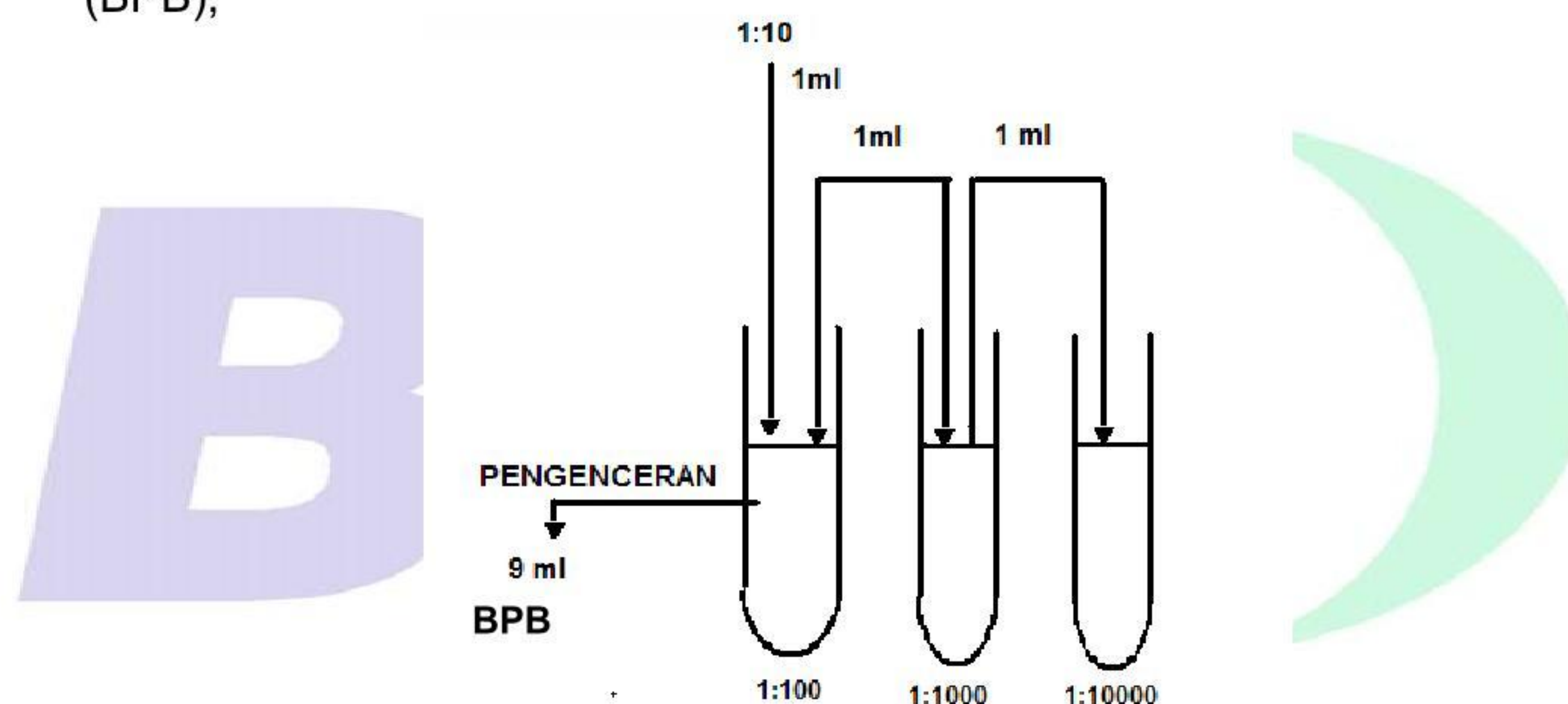
Plate count agar (PCA)

– tryptone	5 g
– yeast extract	2,5 g
– glukosa	1 g
– agar	15 g
– air suling	1000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.9.2.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*

- b) pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran (10^{-1} sampai dengan 10^{-4}) ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- c) tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu (45 ± 1) °C ke dalam masing-masing cawan petri;
- d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam; dan
- h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.9.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.9.2.6 Pernyataan hasil

A.9.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua; dan
 d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
 - jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
 - perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
 - perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.
 Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu rantai, dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.9.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.9.3 *Coliform* dan *Escherichia coli*

A.9.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, sedangkan pertumbuhan *E.coli* diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.9.3.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ($45,5 \pm 0,2$) °C;
- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril terkalibrasi, berskala 0,1 mL;
- e) Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- f) Tabung reaksi dan tabung *Durham*; dan
- g) Jarum Ose dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.9.3.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / lauryl tryptose (LT) broth*;
- Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2%*;
- Escherichia coli (EC) broth*;
- Agar *Levine's eosin methylene blue (L-EMB)*;
- Plate count agar (PCA)*;
- Gram stain*;
- Tryptone (tryptophane) broth*;
- Pereaksi *Kovacs'*;
- Methyl red – Voges Proskauer (MR – VP) broth*;
- Pereaksi *Voges Proskauer*;
- Larutan merah metil;
- Koser's citrate broth*;
- Peptone diluents 0,1%*;
- Pereaksi indol;
- Larutan kalium hidroksida, *KOH 40%*;
- Butterfield's phosfat buffered dilution water (BPB)*;
- Larutan alfa naftol 5%; dan
- Kristal kreatin.

A.9.3.4 Cara kerja

A.9.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk *Coliform*

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.9.1;
- inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulphate tryptose (LST) broth* yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama (48 ± 2) jam;
- amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan positif;
- tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan negatif, lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

A.9.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk *Coliform*

- Kocok tabung *LST broth* yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung *LST broth* yang positif ke dalam tabung *BGLB broth 2%* yang berlainan;
- masukkan tabung-tabung *BGLB broth 2%* ke dalam inkubator pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama (48 ± 2) jam;
- Tentukan APM sesuai dengan Tabel A.2 berdasarkan jumlah tabung *BGLB broth* yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; dan
- laporkan *Coliform* sebagai APM per gram.

A.9.3.4.3 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung EC *broth* yang berlainan;
- inkubasikan tabung-tabung EC *broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan positif;
- apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan positif; dan
- lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.9.3.4.4 APM - Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati;
- ambil koloni sebesar satu mata Ose, kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm;
- inkubasikan cawan agar L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam;
- dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga pada tabung agar miring PCA;
- inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ dan gunakan untuk uji selanjutnya;
- buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini, serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas,
 - uji indol;
 - Inokulasi tabung *tryptone (trptophane) broth*;
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'; dan
 - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
 - uji *Voges Proskauer* ;
 - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril;
 - tambahkan 0,6 mL larutan alfa naftol 5% dalam alkohol, dan 0,2 mL larutan KOH 40% serta beberapa butir kristal kreatin; dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji merah metil;
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung; dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah, dan negatif bila terbentuk warna kuning.
 - uji sitrat;
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan hati-hati menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain;
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$; dan

- uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
- uji pembentukan gas dari lactase.
 - Inokulasikan tabung LST *broth* dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
 - periksa tabung-tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.9.3.4.5 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 - Reaksi biokimia *Escherichia Coli* pada uji IMVIC

<i>E. coli</i>	Indol	Merah metil	<i>Voges Proskauer</i>	Sitrat
Varietas I	+	+	-	-
Varietas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila :
 - uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - - sesuai dengan Tabel A.1
 - pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak berspora; dan
 - terbentuknya gas dalam *broth* dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C .
- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 - APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

A.9.4 *Salmonella* sp.

A.9.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.9.4.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 2)°C;
- b) Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator* (4 ± 2)°C;
- c) Otoklaf terkalibrasi;
- d) Oven terkalibrasi;
- e) Neraca, kapasitas 2000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- f) Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- g) Penangas air, (49 ± 1)°C;
- h) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ($42 \pm 0,2$)°C;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, labu Erlenmeyer 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;
- p) Jarum Ose (diameter ± 3 mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

A.9.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Lactose broth*;
- b) *Tetrathionate (TT) broth*;
- c) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) (media RV harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) Agar *Xylose lysine desoxycholate* (XLD);
- e) Agar *Hektoen enteric* (HE);
- f) Agar *Bismuth sulfite* (BS);
- g) Agar *Triple sugar iron* (TSI);

- h) *Tryptone (atau tryptophane) broth* (TB);
- i) *Trypticase soy-tryptose broth* (TSTB);
- j) *Methyl red-Voges Proskeaur (MR-VP) broth*
- k) *Agar Simmons citrate*;
- l) *Urea broth*;
- m) *Rapid urea broth*;
- n) *Malonate broth*;
- o) *Lysine iron agar* (LIA) (Edward dan Fife)
- p) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- q) *Potassium cyanide* (KCN) *broth*;
- r) *Phenol red carbohydrate broth* (*Phenol red lactose broth* dan *Phenol red red sucrose broth*) atau *Purple carbohydrate broth* (*Purple lactose broth* dan *Purple sucrose broth*);
- s) *Phenol red dulcitol* atau *Purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*;
- t) *Agar MacConkey*;
- u) *Brain heart infusion* (BHI) *broth*;
- v) *Tryptose blood agar base*;
- w) *Tergitol Anionic 7*;
- x) Pereaksi Kovacs';
- y) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- z) Kristal kreatin fosfat;
- aa) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40%;
- bb) Larutan *bromocresol purple dye*, 0,2%;
- cc) Indikator merah metil;
- dd) Indikator *phenol red* atau *bromocresol purple*;
- ee) Air suling steril;
- ff) Larutan *physiological saline*, 0,85% (steril);
- gg) Larutan *formanitized physiological saline*;
- hh) *Formanitized antigen*;
- ii) Alfa naftol;
- jj) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*;
- hh) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*;
- ll) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*; dan
- mm) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai.

A.9.4.4 Cara Kerja

A.9.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL *lactose broth* . Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 500 mL dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai (6,8 ± 0,2);
- c) tambahkan 2,25 mL larutan *Tergitol Anionic 7*, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya 1/4 putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.

A.9.4.4.2 Pengkayaan

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan kedalam 10 mL media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate* (TT) *broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan

- c) inkubasikan media RV pada suhu $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi dan TT *broth* pada $(35 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam.

A.9.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan TT *broth* ke dalam cawan petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RV;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
 XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam.
 Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;
 HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam.
 Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
 BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam.
 Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;
- f) dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, agar miring LIA harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu $(5 - 8) ^\circ\text{C}$;
- g) inkubasi agar miring TSI dan LIA pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H_2S yang berlebihan. Pada TSI, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan alkalin (merah) pada media agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa memproduksi H_2S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA biakan *Salmonella* sp. Akan menghasilkan reaksi alkalin (ungu) pada tusukan pada tabung agar tegak. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan negatif. Umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk H_2S pada agar miring LIA. Beberapa biakan non *Salmonella* sp. membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan dianggap sebagai *Salmonella* sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang menghasilkan asam pada tusukan media agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta reaksi asam pada tusukan pada media agar tegak TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* sp. dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media agar tegak LIA dan asam pada agar miring TSI, serta reaksi asam pada tusukannya di media agar tegak TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp.. Bila biakan TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* sp. (alkalin pada bagian miring

dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang diduga dari media selektif yang tidak memberikan biakan duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan

- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga biakan presumtif TSI dari 1 set media agar selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga biakan presumtif yang diinokulasikan dari RV; dan
 - jika tiga biakan presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media agar selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 biakan TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

A.9.4.5 Identifikasi *Salmonella* sp.

A.9.4.5.1 Biakan campuran

- a) Apabila biakan agar TSI terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media agar *MacConkey*, HE atau XLD broth. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C . Amati koloni yang diduga *Salmonella* sp., yaitu :
 - agar *Mac Conkey*. Koloni tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang pengendapan *bile* disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh;
 - agar *hektoen enteric* (HE). Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam; dan
 - agar *xylose lysine desoxycholate* (XLD). Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA sesuai dengan A.9.4.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.9.4.4.3.g.

A.9.4.5.2 Biakan murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose ke dalam tabung *urea broth*. Karena kadang-kadang tabung *urea broth* yang tidak diinokulasikan biakan akan berubah warna menjadi merah keunguan (uji positif) maka perlu dibuat tabung *urea broth* tanpa inokulasi sebagai kontrol. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) Uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose berdiameter 3 mm ke dalam tabung *rapid urea Broth*. Inkubasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Biarkan *Salmonella* sp. akan memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna) pada uji urease, walaupun demikian perlu uji lebih lanjut.

A.9.4.5.3 Pengujian biakan urease negatif

- a) *Lysine decarboxylase* (LD) broth;
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 Ose koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari agar miring TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2% *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.

- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*; dan inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah inkubasi 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
- *Potassium cyanide* (KCN) *broth*
Pindahkan 1 Ose biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan bila perlu dilapisi dengan parafin atau film. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp. tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.
 - *Malonate broth*
Pindahkan 1 mata Ose dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.
 - Uji indol
Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 mL biakan ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.
Nyatakan biakan sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

A.9.4.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing agar TSI yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
- *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35°C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
 - *Trypticase soy tryptose* (TST) *broth* dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL biakan di atas.
- b) siapkan 2 biakan dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan $\pm 0,5$ mL larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48°C sampai dengan 50°C . Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam, sebagai berikut:
- Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
 - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.9.4.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) antiserum ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.9.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., biakan yang memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 butir 1-11. Jika 1 biakan TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Biakan yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.9.4.5.1 diatas dan uji kembali, sesuai dengan A.9.4.5.2 Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap biakan yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.3 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - inokulasi *broth* ini dengan biakan agar TSI miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika biakan memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp., kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;

Ikuti prosedur sesuai dengan A.9.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. pada biakan yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*; dan

Inokulasi media dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C;

Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

 - Pindahkan 1 mL MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
 - Tambahkan 0,6 mL alfa naftol dan aduk;

- Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40% dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
- Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi VP negatif.

Uji merah metil (MR)

- Tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator merah metil ke dalam 5 mL media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
- amati hasilnya dengan segera; dan
- umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) Agar Simmons citrate.

- Inokulasi media dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari agar miring TSI, dengan cara menggores agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
- nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil sitrat positif; dan
- negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.9.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. biakan-biakan yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan-biakan yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.4. Bila tidak ada 1 biakan TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia sesuai dengan A.9.4.5.3 terhadap biakan yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	Glucose (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	Lysine decarboxylase (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	hitam	tidak hitam	+
4.	Urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	Lysine decarboxy broth	warna ungu	warna kuning	+
6.	Phenol red dulcitol broth	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN broth	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	Malonate broth	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	Uji indol	permukaan bewarna nila	permukaan bewarna kuning	-
10.	Uji polyvalent flagellar	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji polyvalent somatic	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	Phenol red lactose broth	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	Phenol red sucrose broth	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-

Tabel A.3 (lanjutan)

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
14	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15	Uji <i>methyl red</i>	merah menyebar	Kuning menyebar	+
16	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V
Keterangan: ^a + adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari; - adalah 90% atau lebih negatif dalam satu atau dua hari; V adalah variabel; ^b adalah mayoritas dari biakan <i>Salmonella arizonae</i> : negatif; dan ^c adalah mayoritas dari biakan <i>Salmonella arizonae</i> : positif.				

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji <i>indol</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H) atau uji <i>indol</i> dan uji Spicer Edwards <i>flagellar</i>	positif (permukaan warna violet) negatif (tidak ada penggumpalan) positif (permukaan warna violet) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan KCN broth	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	KCN broth, uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan <i>methyl red</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah uji <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp..		

A.9.5 *Staphylococcus aureus*

A.9.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulasi.

A.9.5.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering, terkalibrasi;

- c) *Spreader* steril dari gelas;
- d) Botol pengencer 500 mL;
- e) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL terkalibrasi;
- f) Tabung reaksi;
- g) Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- h) Jarum Ose.

A.9.5.3 Pembenihan dan pereaksi

- a) *Baird-parker agar* (BPA);
- b) *Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- c) Plasma koagulase dari kelinci.

A.9.5.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.9.1;
- b) pipet 1 mL larutan contoh ke dalam 3 cawan petri berisi media BPA (misalkan 1 mL dibagi menjadi 0,3 mL; 0,3 mL; dan 0,4 mL larutan contoh);
- c) sebarkan contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh media (\pm 10 menit). Jika contoh tidak mudah terserap oleh media, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- d) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan
- e) pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung koloni yang diduga sebagai *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum Ose.

A.9.5.5 Uji koagulasi

- a) Pindahkan 5 koloni sampai dengan 10 koloni yang diduga sebagai *Staphylococcus aureus* ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL BHIB;
- b) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- c) tambahkan plasma koagulase kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam biakan BHIB dan campur;
- d) inkubasikan campuran plasma koagulase kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam, kemudian amati terbentuknya penggumpalan setiap 6 jam. *Staphylococcus aureus* positif apabila terbentuk gumpalan yang kokoh dan utuh serta dapat bertahan dalam tabung ketika dibalikkan;
- e) amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- f) ratakan koloni (n) dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengencernya (F); dan
- g) hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g contoh.

A.9.5.6 Perhitungan

$$\text{Staphylococcus aureus (koloni/25 g)} = n \times F \times 25$$

Keterangan:

- n adalah jumlah koloni, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g); dan
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

Bibliografi

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 2002.05, Cholecalciferol (Vitamin D₃) in Selected Foods, Liquid Chromatography*, 18th Edition, Chapter 45.1.22A.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 938.06, Fat in Butter*, 18th Edition, Chapter 33.6.04.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*. 18th Edition, Chapter 9.1.09.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 920.116, Moisture in Butter*, 18th Edition, Chapter 33.6.03.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 960.29, Salt in Butter*, 18th Edition, Chapter 33.6.06.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 2001.13, Vitamin A(Retinol) in Foods, Liquid Chromatography*, 18th Edition, Chapter 45.1.34.

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Chapter 4.

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2007. *Salmonella sp.*. Chapter

SNI 7387 : 2009. *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.*

SNI 7388 : 2009. *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.*